

Иммунохроматографические методы определения антител к антигенам *Treponema pallidum*

С.В. Ротанов, С.Р. Османова

Modern immunochromatographic methods for determination of anti-treponema pallidum antigen antibodies

S.V. ROTANOV, S.R. OSMANOVA

об авторах:

С.В. Ротанов — проф. кафедры дерматовенерологии лечебного факультета ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Москва, д.м.н., доц.
С.Р. Османова — аспирант кафедры дерматовенерологии лечебного факультета ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Москва

Представлен обзор научных публикаций о клинической значимости применения современных иммунохроматографических методов для определения антител к иммунодоминантным антигенам возбудителя сифилитической инфекции *Treponema pallidum*.

Показано, что иммунохроматографические наборы реагентов удобны в использовании, выполняются на небольшом количестве биологического материала, не требуют специального медицинского оборудования, обладают высокой чувствительностью и специфичностью, особенно при проведении исследований с образцами сыворотки или плазмы крови; использование образцов цельной крови снижает чувствительность метода.

Иммунохроматографические исследования предназначены для оперативного экспресс-обследования населения с целью выявления больных сифилисом в полевых условиях или в медицинских учреждениях, обеспечивающих первичной прием населения, не имеющих собственных клинических лабораторий.

Ключевые слова: сифилитическая инфекция, иммунохроматографические методы исследования, клиническая значимость.

The authors present a review of research publications about clinical significance of using modern immunochromatographic methods for determination of anti-immunodominant antigen antibodies of syphilis pathogen *Treponema pallidum*.

Immunochromatographic sets of chemicals proved to be convenient in use, can be used with a small amount of biological materials, do not demand any specialized medical equipment, have high sensitivity and specificity, in particular, for tests with blood serum or plasma samples; when whole blood samples are used, this reduces the method sensitivity.

Immunochromatographic tests are intended for prompt express examination of the population to reveal syphilis patients under field conditions or at medical institutions consulting primary patients and not having their own clinical laboratories.

Key words: syphilitic infection, immunochromatographic examination methods, clinical significance.

■ В последние годы в клинической лабораторной диагностике для определения ряда биохимических показателей и выявления специфических маркеров — антигенов или антител к антигенам возбудителей инфекционных заболеваний (вирусы иммунодефицита, гепатитов В и С человека, хламидии, сальмонеллы, микобактерии туберкулеза, плазмодии малярии и др.) — разработаны и получили широкое распространение иммунохроматографические методы исследования [1—5]. Появление этих новых видов диагностических исследований стало возможным благодаря использованию технологий, поддерживаемых патентами США, касающихся разработки новых синтетических нейтральных волокнистых материалов и их применения в качестве твердой фазы при проведении иммунохимических исследований [6—8].

Используемая при этом лабораторная технология в англоязычной литературе получила дополнительное название — **lateral flow immunoassay, LFIA** (иммунологическое исследование в боковом потоке) [3, 9]. Исследование осуществляется на узких полосках из синтетического мелкопористого материала (стрипах), которые для удобства использования могут быть упакованы в индивидуальные пластиковые кассеты или закреплены на плотной пластиковой подложке, с разметкой участков для нанесения исследуемых образцов биоматериала — **S** (sample), учета результатов исследования — **P** (patient) и контроля валидности исследования — **C** (control) [3, 8]. Наборы реагентов для проведения LFIA созданы на основе принципов «сухой химии»: все необходимые для исследования реагенты нанесены, высушены или инкорпорированы на стрипах другим способом в условиях промышленного производства [10]. При нанесении на стартовую зону тест-полоски **S** исследуемого образца в жидкой форме происходит смачивание материала, растворение реагентов, взаимодействие с ними и перемещение продуктов взаимодействия вдоль полоски пористого материала стрипа благодаря силам капиллярного натяжения [3, 7, 8].

Благодаря удобству использования, малым размерам, потребности в небольшом количестве исследуемого образца и короткому времени проведения исследования иммунохроматографические наборы реагентов нашли применение в самых разных областях народного хозяйства (ветеринарии, биологии, сельском хозяйстве, контроле качества пищевых продуктов и водных ресурсов, геологоразведке и многих других) [3, 11—13].

Различные варианты диагностических стрипов на основе LFIA-технологии были разработаны и для выявления антител к антигенам возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, в том числе сифилитической инфекции [14, 15]. При проведении скрининга населения для выявления сифилитической инфекции специфические антитела, содержащиеся

в исследуемом образце крови, связываются с антигенами *Tr. pallidum*, конъюгированными с частицами коллоидного золота или селена, образуя иммунные комплексы. Мигрируя с хроматографическим фронтом вдоль мембраны тест-полоски, иммунные комплексы достигают зоны учета результата исследования **P**, где нанесены иммобилизованные антигены *Tr. pallidum*. На этом участке происходит связывание и фиксация этих иммунных комплексов за счет свободных валентностей антитрепонемных антител, что приводит к формированию окрашенной полосы красного цвета различной интенсивности за счет концентрации частиц золота или селена. При отсутствии в исследуемом образце антител к антигенам *Tr. pallidum* окрашенной полосы в зоне чтения результата не образуется [16, 17].

При конструировании дизайна тест-полосок для иммунохроматографических (LFIA) исследований разработчики в качестве антигенов применяли как рекомбинантные химерные аналоги основных иммунодоминантных антигенов *Tr. pallidum* (Tp47, Tp15, Tp17), так и лизатные антигены, полученные из патогенных лабораторных [18—20] и диких штаммов *Tr. pallidum* [21]. Таким образом, с учетом антигенного материала, наносимого на тест-полоски, иммунохроматографические наборы для диагностики сифилитической инфекции относятся к трепонемным тестам, а по специфическим характеристикам выявляемых в LFIA антител они сопоставимы с результатами, получаемыми в иммуноферментном анализе (ИФА), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и иммуноблоттинге [22]. Наборы реагентов для определения антитрепонемных антител позволяют осуществлять исследования с сывороткой, плазмой и цельной венозной или капиллярной кровью [19, 23]. Кроме того, не имеется принципиальных противопоказаний к использованию LFIA для исследования спинномозговой жидкости или слюны пациентов в качестве экспресс-метода.

Применение LFIA-наборов реагентов для диагностики сифилиса в научных и медицинских целях демонстрировало различные показатели клинической чувствительности и специфичности в зависимости от разработчика и производителя изучавшегося набора реагентов или вида исследованного биологического материала (сыворотка, плазма или цельная кровь).

Так, F. Radebe и соавт. (1999) не установили различий в чувствительности и специфичности результатов LFIA при проведении исследований с сывороткой или цельной кровью пациентов, обратившихся в клинику по поводу инфекций, передаваемых половым путем. При изучении 860 образцов крови (охарактеризованных в реакции иммунофлуоресценции с абсорбцией) чувствительность LFIA составила 92%, специфичность — 96%, прогностическое значение положительного результата — 96%, отрицательного — 98%. Также не было установлено достоверных различий

в результатах исследования сыворотки крови в LFIA, РПГА и RPR (быстрый плазмареагиновый тест на сифилис) [24].

В то же время в других публикациях были приведены доказательства существенно более низкой клинической чувствительности LFIA при исследовании образцов цельной крови больных сифилисом по сравнению с результатами исследования сыворотки / плазмы крови этих пациентов [25—27].

При обследовании 3586 работниц коммерческого секса в Перу было показано, что в условиях лаборатории при использовании RPR положительные результаты наблюдали в 2 раза чаще (5,8%), чем при исследовании в полевых условиях образцов цельной крови с помощью LFIA технологии (2,8%); полученные данные были соотнесены с результатами референсного исследования всех проб в РПГА. Проведенная работа выявила недостаточную клиническую чувствительность применения наборов «Determine Syphilis TP» (LFIA технология) для исследования цельной крови — на уровне 39,3% при специфичности 99,2%. Частота определения непригодных для оценки теста результатов (invalid test) составила всего 0,3% [25].

Также недостаточно высокие показатели были продемонстрированы при исследовании на сифилис цельной капиллярной крови 510 пациентов с применением LFIA в Бразилии: клиническая чувствительность составила 57% при высокой специфичности (99%) и удовлетворительном уровне предсказательной ценности положительных (91%) и отрицательных (91%) результатов. Результаты LFIA были оценены относительно данных, полученных в иммунофлюоресцентном исследовании. Экспресс-исследование в LFIA позволило выявить не более 79% пациентов с активными формами сифилитической инфекции [26].

К. Nessa и соавт. (2008) при обследовании 684 работниц коммерческого секса в Бангладеш не установили существенных различий в результатах, полученных в полевых условиях на основании только LFIA медицинскими работниками, не специализирующимися на проведении лабораторных тестов, по сравнению с данными последующего комплексного исследования этих же образцов (LFIA, RPR и РПГА), проведенного в условиях медицинского учреждения квалифицированными лаборантами. При исследовании образцов крови в LFIA по отношению к результатам исследования в RPR и РПГА показатели чувствительности и специфичности составили 94,5 и 92,6% соответственно, что позволило исследователям рекомендовать иммунохроматографический метод для скрининга населения на сифилитическую инфекцию [27].

К иным выводам пришли Р. Montoya и соавт. (2006). Ими была определена более высокая клиническая чувствительность LFIA при выявлении активных форм сифилитической инфекции в условиях референсной лаборатории — 95,3% по сравнению с ре-

зультатами использования этого теста в учреждениях здравоохранения, обеспечивающих первичный прием населения, — 84,1%. Примечательно, что показатель чувствительности RPR-теста в этих же учреждениях был еще ниже — 70,7% [28].

В проведенных Y. Angue и соавт. (2005) сравнительных испытаниях по оценке клинической эффективности набора «Abbott Determine» (основанного на LFIA технологии) по отношению к результатам стандартного лабораторного исследования с использованием VDRL-антигена были также показаны высокая чувствительность (92,0%) и специфичность (94,6%) при недостаточной предсказательной ценности положительных (42,6%) и высокой предсказательной ценности отрицательных (99,6%) результатов исследования. Это значило, что у 92% больных сифилитической инфекцией с применением LFIA были получены положительные результаты, однако среди этих результатов доля истинно положительных составила только 42,6%, что заметно снижало диагностическую ценность исследования. При более высокой стоимости набора реагентов для проведения Abbott Determine уровень суммарных материальных затрат на выполнение этого исследования был ниже, чем при проведении VDRL-теста, что позволило рекомендовать его для обследования беременных в регионах со слаборазвитой инфраструктурой оказания медицинской помощи [29].

Сходные по величине показатели клинической эффективности были получены F. Tinajeros и соавт. (2006) в Боливии при обследовании беременных в условиях лабораторий акушерских клиник с помощью наборов «Abbott Determine Syphilis TP»: специфичность — 91,8%, чувствительность — 98,5%, предсказательная ценность положительных результатов — 99,7%, отрицательных — 71,0%. Между тем в RPR показатели составили 75,7, 99,0, 99,0 и 76,9% соответственно. В качестве референсных были использованы результаты исследования этих образцов в реакции агглютинации желатиновых частиц, сенсibilизированных антигенами бледной трепонемы (TP-PA) [30]. Высокие показатели специфичности и чувствительности (100 и 98,4% соответственно) были получены с указанными наборами реагентов и китайскими исследователями; при этом соответствующие показатели в нетрепонежном RPR-тесте были также ниже, чем в LFIA (65,1 и 98,4% соответственно) [31].

Клиническая значимость LFIA также была изучена L. van Dommelen и соавт. (2008) при сопоставлении результатов исследований в иммунохроматографическом и двух разных иммуноферментных тестах 330 образцов сыворотки крови, полученных от больных сифилисом (145) и здоровых лиц (185): чувствительность — 92% и специфичность — 79% [32].

Обследование 14 967 пациентов, проведенное в Центре клинических лабораторий (г. Ксиамен, Ки-

тай) с использованием иммунохроматографического теста с коллоидным золотом на основе рекомбинантных антигенов TrN17 и TrN47 и реакции иммунофлюоресценции с абсорбцией, позволило выявить 1326 больных сифилитической инфекцией. При этом также были продемонстрированы достаточно высокие показатели чувствительности (99,38%), специфичности (99,96%) и предиктивной ценности положительных результатов (99,61%) исследования в LFIA. Дополнительные исследования 500 образцов сыворотки крови, полученных от пациентов с заболеваниями, при которых часто наблюдаются положительные результаты в различных серологических тестах на сифилис, установили, что неспецифическое воздействие биологических или химических факторов, обуславливающих ложноположительные результаты в других серологических тестах, при проведении LFIA встречается чрезвычайно редко. На основании полученных данных исследователи охарактеризовали изученный ими метод как недорогой и быстрый, позволяющий использовать его для скрининга населения на наличие сифилитической инфекции или в качестве подтверждающего теста наравне с реакцией иммунофлюоресценции (в модификации определения иммуноглобулинов класса G с абсорбцией) [33].

Экспертами Всемирной организации здравоохранения осуществлялся контроль над разработкой и практическим использованием всех видов экспресс-методик исследования для диагностики сифилиса с целью отбора наиболее перспективных наборов реагентов для практического применения в рамках экспедиционной работы по выявлению больных сифилитической инфекцией и снижению частоты врожденного сифилиса у детей в развивающихся странах [15, 16, 34, 35]. С целью оценки клинической эффективности многочисленных наборов реагентов, разработанных на основе технологии LFIA, в рамках мероприятий международной программы «Инициатива диагностики заболеваний, передаваемых половым путем (Sexually Transmitted Diseases Diagnostic Initiative (SDI))», в 2002—2005 гг. было проведено международное исследование по изучению 9 наборов для экспресс-диагностики сифилиса разных производителей [15, 35, 36].

В соответствии с предварительно разработанным протоколом в 8 странах, относящихся к различным географическим зонам, было проведено изучение комплаентности использования наборов, а также показателей чувствительности, специфичности и стабильности результатов проведения теста. Полученные данные позволили охарактеризовать большую часть наборов как пригодные для проведения скрининга пациентов на наличие у них сифилитической инфекции

в полевых условиях. Наборы для LFIA имели длительные сроки годности (не менее 12 мес.), и для их хранения не требовалось холодильного оборудования (хранение при 5—30 °C). Проведение диагностического исследования не требовало дополнительного лабораторного оборудования или источника энергообеспечения, результаты теста учитывались через 8—15 мин., но они были доступны для повторной оценки или архивирования в течение длительного времени [35, 36]. По показателям клинической эффективности были выделены три лидирующих набора реагентов, испытания которых были продолжены в реальных полевых условиях.

По результатам исследований, проведенных в ФГУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России (Москва) в рамках вышеуказанной международной программы, наиболее высокие показатели клинической чувствительности и специфичности были получены с набором «Determine™ Syphilis TP» производства фирмы «Abbott Laboratories», США (по 100% соответственно) и «Bioline Syphilis anti-TP Test Card» производства фирмы «Pacific Biotech Co», Таиланд (96 и 98% соответственно); другие диагностические наборы не преодолели порогового уровня 95%, отобранного в качестве нижнего допустимого предела для показателей диагностической эффективности [15].

В Российской Федерации в установленном законом порядке в качестве изделий медицинского назначения зарегистрированы и разрешены к производству, распространению и применению несколько наборов реагентов на основе LFIA: «Determine™ Syphilis TP» производства фирмы «Abbott Japan Co., Ltd», Япония (регистрационное удостоверение № ФС 2006/1264) и «ИХА-антиТП-фактор» производства фирмы ООО «ФАКТОР-МЕД», Россия (регистрационное удостоверение № ФС 2007/01604).

Однако лаборатории Российской Федерации, осуществляющие исследования полученного от больных биоматериала с целью выявления сифилитической инфекции, не имеют практического опыта работы с наборами реагентов LFIA. В настоящее время остаются нерешенными вопросы, регламентирующие порядок и показания к применению иммунохроматографических методов исследования для скрининга населения с целью выявления сифилитической инфекции.

Все вышеизложенное аргументирует проведение исследований по определению аспектов клинического применения LFIA и места этих технологий среди других лабораторных методов диагностики сифилиса, а также исследования по разработке алгоритма применения этих методов в России для выявления сифилитической инфекции. ■

Литература

- Branson B.M. Point-of-care rapid test for HIV antibodies. *J Lab Med* 2003; 27: 288—295.
- Hurt A., Barr I. Rapid diagnostic kits for influenza. *Microb Australia* 2006 (May); 31—63.
- Rosen S. Market Trends in Lateral Flow Immunoassay. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press, 2009: 35—50.
- Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 2 (2009) (http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599467_eng.pdf).
- Akyar I., Kocagoz T., Sinik G. et al. Lateral flow assay for rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and species of *Mycobacterium* other than *tuberculosis* grown in Löwenstein-Jensen medium. *Indian J Med Microbiol* 2010 (Oct-Dec); 28 (4): 308—312.
- Campbell R.L., Wagner D.B., O'Connell J.P. Solid-phase assay with visual readout. US Pat. 4.703.017; 1987.
- Rosenstain R.W., Bloomster T.G. Solid-phase assay employing capillary flow. US Pat. 4.855.240; 1989.
- May K., Prior M.E., Richard I. Capillary assay and device therefore comprising mobilizable particulate labeled reagents. US Pat. 5.622.871; 1997.
- O'Farrell B.O. Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press, 2009: 1—34.
- Ponti J.S. Material Platform for the Assembly of Lateral Flow Immunoassay Strips. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press, 2009: 49—34.
- Денисова О.В., Тогузов Р.Т. Значение и перспективы использования методов бесприборной диагностики в клинической лабораторной практике. *Клин. лаб. диагн.* 2001; 9: 42.
- Jiang T., Liang Z., Ren W. et al. Development and validation of a lateral flow immunoassay using colloidal gold for identification of serotype-specific foot-and-mouth disease virus O, A and Asia 1. *J Virol Methods* 2001 (Jan); 171 (1): 74—80.
- Alveres I., Gutierrez G., Barrandeguy M., Troino K. Immunochromatographic lateral flow test for detection of antibodies Infectious anemia virus. *J Virol Methods* 2010 (Aug); 167 (2): 152—157.
- Федосова Н.Ю., Вяткина Т.Г., Баранова С.Г. «Сифилис-экспресс» — тест-система для быстрого выявления антител к *Treponema pallidum* в сыворотке, плазме и цельной крови // IX Всероссийский съезд дерматовенерологов. М, 2005: 51.
- Peeling R.W., Holmes K.K. et al. Rapid tests for sexually transmitted infections (STDs): the way forward. *Sex Transm Infect* 2006 (Dec); 82 (5): 1—6.
- Chum P. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press 2009: 75—93.
- Mansfield M.A. Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press 2009: 94—114.
- Ротанов С.В., Фриго Н.В., Ключева В.И. Сравнительное изучение иммунохроматографических наборов для экспресс-диагностики сифилиса. *Клин. лаб. диагн.* 2008; 2: 42—45.
- Determine™ Syphilis TP (www.determinetest.com/news).
- McGill M.A., Edmondson D.G., Carroll J.A. et al. Characterization and serological analyses of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect Immun* 2010 (Jun); 78 (6): 2631—43.
- Seña A.C., White B.L., Sparling P.E. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for 21st century. *Clin Infect Dis* 2010 (Sep); 51 (6): 700—708.
- Чепурченко Н.В., Гладышева М.В., Обрядина А.П. Новые возможности использования рекомбинантных антигенов в серодиагностике сифилиса. *Клин. дерматол. и венерол.* 2006; 6: 28—31.
- Kevin J. A New Platform For Lateral Flow Immunoassay Tests. In: Wong R.C. (ed.) et Tse H.Y. (ed.) *Lateral Flow Immunoassay*. New-York: Humana Press 2009: 115—129.
- Radebe F.M., Khumalo S., Tshabalala V. et al. Evaluation of two rapid tests for the detection of antibodies to syphilis. Lesedi Africa'99, IUSTI/STD/HIV 6th World Congress & 38th IUSTI General Assembly. 21-24 Nov 1999, Sun City. Abstract book: STD 12. (цит.: ИППП 2000; 1: 52).
- Campos P.E., Buffardi A.L., Chiappe M. et al. Utility of the Determine Syphilis TP rapid test in commercial sex venues in Peru. *Sex Transm Infect.* 2006 (Dec); 82 (5): 22—5.
- Benzaken A.S., Sabido M., Galban E.G. et al. Field evaluation of the performance and testing cost of a rapid point-of care test for syphilis in red-light district of Manaus, Brazil. *Sex Transm Inf* 2008; 84: 297—302.
- Nessa K., Alam A., Chawdhury F.A. et al. Field evaluation of simple rapid tests in the diagnosis of syphilis. *Int J STD AIDS* 2008 (May); 19(5): 316—20.
- Montoya P.J., S.A. Lukehart, P.E. Brentinger et al. Comparison of the diagnostic accuracy of a rapid immunochromatographic & rapid plasma regain test for antenatal syphilis screening in Mozambique. *Bull WHO* 2006 (Feb); 84 (2): 97—104.
- Angue Y., Yaouieb A., Mola G. et al. Syphilis serology testing: a comparative study of Abbot Determine, Rapid Plasma Reagin (RPR) card test and Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) methods. *P N G Med J* 2005 (Sep-Dec); 48 (3—4): 168—173.
- Tinajeros F., Grossman D., Richmond K. et al. Diagnostic accuracy of a point-of-care syphilis test when used among pregnant women in Bolivia. *Sex Transm Inf* 2006 (Dec); 82 (5): 17—21.
- Wang L.N., Zheng H.Y., Li J. et al. [Sensitivity and specificity of ELISA based on recombinant *T.pallidum* rapid regain test in diagnosis of syphilis: a comparative study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007 (Jun); 87(24): 1721—2.
- van Dommelen L., Smismans A., Goossens V.J. et al. Evaluation of a rapid one-step immunochromatographic test and two immunoenzymatic assays for the detection of anti-*Treponema pallidum* antibodies. *Sex Transm Inf* 2008; 84: 292—296.
- Lin L.R., Fu Z.G., Dan B. et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TpN17 и TpN47. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 (Nov); 68 (3): 193—200.
- Peeling R.W., Ye H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bull World Health Organ* 2004 (Jun); 82 (6): 439—46.
- Laboratory-based evaluation of rapid syphilis diagnostics. Results from 8 SDI Sites. UNDP/World Bank/WHO; The Sexually Transmitted Diseases Diagnostics Initiative (SDI); Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR); Geneva 2003; 32.
- Herring A. J., Ballard R.C., Pope V. et al. A multi-centre evaluation of nine rapid, point-of-care syphilis tests using archived sera. *Sex Transm Infect* 2006; V: 7—12 (www.stijournal.com).